

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21720081152578

UDC____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

人 CD4 胞外区及人和小鼠 MHC II 分子
胞外区的表达及活性鉴定

Expression and activity identification of extracellular region
of Human CD4 and Human or Mice MHC class II molecule

盖顺

指导教师姓名: 顾颖 助理教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

中文摘要.....	V
英文摘要.....	VI
ABBREVIATION (缩写词)	VIII
前 言.....	1
1 人 CD4 概况.....	1
1.1 人 CD4 分子的结构.....	1
1.2 CD4 的相关形式	2
2 CD4 和 MHC II 在免疫应答中的作用	3
2.1 CD4 与免疫应答	3
2.2 CD4 与移植排斥反应	5
2.3 MHC II 分子的结构.....	5
2.4 CD4 与 MHC II, TCR 的相互作用	7
3 CD4 与 HIV 的关系.....	9
3.1 HIV 感染机制.....	9
3.2 CD4 与 HIV 相互作用.....	10
3.3 CD4 与 HIV 临床治疗.....	11
4 体外细胞评价系统.....	12
5 本论文的研究背景、思路和意义.....	13
材料与方 法	14
1 材料.....	14
2 方法.....	19
结果与分析	33
1 人 CD4 蛋白胞外段的真核表达	33

1.1 真核表达质粒的构建	33
1.2 梭华转染	34
1.3 活性分析	35
2 人 CD4 蛋白胞外段的原核表达	38
2.1 原核表达质粒的构建	38
2.2 CD4 多肽在大肠杆菌 BL21 中的表达	40
2.3 包涵体洗涤与纯化	41
2.4 CD4 多肽活性分析	45
3 人及小鼠 MHC II 蛋白胞外段的原核表达	46
3.1 MHC II 蛋白胞外段在大肠杆菌 ER2566 中的表达与纯化	46
3.2 MHC II 活性分析	49
讨论	53
1 CD4 及 MHC II 分子的功能	53
2 CD4 及 MHC II 重组蛋白表达特点分析	53
3 体外细胞评价系统	54
小结与展望	56
参考文献	57
致谢	64

Table of Contents

Abstract in Chinese	V
Abstract in English	VI
ABBREVIATION	VIII
Preface	1
1 Brief summary of CD4	1
1.1 The structure of human CD4 molecule.....	1
1.2 The relevant forms of CD4.....	2
2 The role of CD4 and MHC II in immune response	3
2.1 CD4 and immune response	3
2.1 CD4 and transplant rejection reaction	5
2.2 The structure of MHC II molecule	5
2.1 The interaction between CD4 and MHC II or TCR.....	7
3 The relationship between CD4 and HIV	9
3.1 The mechanism about HIV infection	9
3.2 The interaction between CD4 and HIV	10
3.3 CD4 and HIV clinical therapy	11
4 Cell evaluation system in vitro	12
5 The background, thinkings and meanings of this reseach	13
Materials and Methods	14
1 Materials	14
2 Methods.....	19
Results and Analysis	33

1 The eukaryotic expression of the extralluar region of human CD4.....	33
1.1 The construction of eukaryotic expression's plamid	33
1.2 Sofast transfection.....	34
1.3 The activity analysis of expressed proteins.....	35
2 The prokaryotic expression of the extralluar region of human CD4.....	38
2.1 The construction of prokaryotic expression's plamid	38
2.2 The expression of CD4 polypeptide in <i>E.coli</i> BL21	40
2.3 The pufication of CD4 polypeptide in inclusion-body	41
2.4 The activity analysis of CD4 polypeptide.....	45
3 The prokaryotic expression of the extralluar region of human and mouse MHC II	46
3.1 The expression of MHC II in <i>E.coli</i> ER2566	46
3.2 The activity anaysis of MHC II proteins.....	49
Discussion.....	53
1 The function of CD4 and MHC II	53
2 The analysis about the expression of CD4 or MHC II proteins.....	53
3 Cell evaluation system in vitro.....	54
Brief Summary and Prospect.....	56
Reference.....	57
Acknowledgements.....	64

摘 要

CD4分子在机体免疫系统中起重要作用，它与MHC II、TCR相互作用,形成CD4-MHC II-TCR复合物,介导特异性抗原呈递以及激活CD4⁺T细胞,引发机体特异性的免疫应答。同时，CD4是HIV感染的宿主细胞上主要受体，CD4融合蛋白的药物及CD4的抗体在艾滋病的临床研究中显示了良好的治疗效果。

本研究尝试通过真核及原核表达系统对人 CD4 蛋白胞外段进行表达。真核表达中，应用 CHO 细胞和 293FT 细胞分别表达 CD4 蛋白胞外段，仅含有信号肽的序列有小量表达。原核表达中，应用大肠杆菌 BL21 菌表达的人 CD4 胞外段不同域以包涵体的形式存在，经尿素变性及复性，再经分子筛纯化之后，其纯度能够达到 90%以上。经 HIV-1_{NL4-3} 细胞中和实验，表明 CD4(d1)，CD4(d1-2)，CD4(d1-4)有阻断 HIV-1_{NL4-3} 病毒感染 TZM-b1 细胞的能力，因此表达的蛋白是有活性的。因此通过大肠杆菌这一原核表达系统表达的人 CD4 蛋白胞外段不同域，可用于进一步分析 CD4 抗体的结合表位及动物免疫等研究。

本研究还通过大肠杆菌 ER2566 原核表达系统对人及小鼠 MHC II 蛋白胞外段进行表达。目的蛋白同样以包涵体的形式存在，经尿素变性及复性，再经分子筛纯化之后，其纯度能够达到 90%以上。经竞争实验和 Cell Counting Kit-8 检测，表明小鼠 MHC II 蛋白胞外段 α 链有活性，其他蛋白无活性或低活性，可能与氨基酸突变有关，需要进一步实验验证。

关键词：HIV CD4 MHC II 原核表达 中和实验

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

In the body's immune system, CD4 molecule plays an important role, which mediates specific antigen presentation and initiates specific immune responses by forming trimolecular complexes CD4-MHC II-TCR. Meanwhile, cell surface CD4 molecule is the HIV infected host cell's main receptor, and good therapeutic results have been demonstrated by the use of medicine fusing CD4 and some anti-CD4 antibodies in AIDS clinical research.

In this study, the extracellular region of human CD4 is separately attempted to be expressed through the eukaryotic and the prokaryotic system. In the eukaryotic expression system, the extracellular region of human CD4 which being expressed separately using the CHO and the 293FT cells, only is expressed with being a signal peptide sequence. In the prokaryotic expression system, the human CD4 polypeptide which being expressed in the *E.coli* BL21, after urea denaturation and renaturation, through the molecular sieve chromatography, can reach to above 90% purity. After the HIV-1_{NL4-3} neutralization assay, indicating that CD4(d1), CD4(d1-2), CD4(d1-4) have ability to block HIV-1_{NL4-3} virus' entry into TZM-b1, therefore the proteins are in activity. So the extracellular region of human CD4 through the *E.coli* prokaryotic system, may be used in further analysis including CD4 antibody epitope research and animal immunity and so on.

In this study, the extracellular regions of human and mice MHC II are also expressed through the *E.coli* ER2566 prokaryotic expression system. With the inclusion body form existence, urea denaturation and renaturation, then after molecular sieve chromatography later, its purity can reach 90%. The results of competitive assay and cell counting Kit-8 test demonstrate that only MHC II α chain of mice probably has activity, and others' inactivity is probably devired from the important amino acids' mutations, needing further experiment.

Key words: Human immunodeficiency virus; CD4 molecule; class II major

histocompatibility molecule; prokaryotic expression; neutralization assay

厦门大学博硕士论文摘要库

ABBREVIATION (缩略词)

AA: amino acid, 氨基酸

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome, 获得性免疫缺陷综合征

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

APC: antigen presenting cell, 抗原提呈细胞

bp: base pair, 碱基对

cDNA: Complementary DNA, 互补 DNA

CDR: Complementarity Determining Region, 互补性决定区

CTL: Cytolytic T lymphocyte, 细胞毒性 T 淋巴细胞

Da: Dalton, 道尔顿

DNA: Deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, 酶联免疫吸附测定

FBS: Fetal bovine serum, 胎牛血清

FCM: Flow Cytometry, 流式细胞仪分析

FDA: Food and drug administration, 美国食品和药物管理局

GAM: Goat Anti-Mouse, 山羊抗小鼠

HIV: Human Immunodeficiency Virus, 人类免疫缺陷病毒

HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶

Ig: Immunoglobulin, 免疫球蛋白

Kan: Kanamycin, 卡那霉素

kD: kilo Daltons, 千道尔顿

LacZ: β 半乳糖苷酶

LTR: Long terminal repeat, 长末端重复序列

mAb: monoclonal antibody, 单克隆抗体

MHC: major histocompatibility complex, 主要组织相容性复合体

mRNA: Messenger RNA, 信使 RNA

MW: Molecular Weight, 分子量

Ori: Origin, 复制起始位点

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells, 外周血单核细胞

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

pH: hydrogen ion concentration, 氢离子浓度指数

polyA: Polyadenosine, 多聚腺苷酸

RNA: Ribonucleic acid, 核糖核酸

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction, 反转录聚合酶链式反应

Th: helper T cell, 辅助性 T 细胞

前言

1 人 CD4 概况

1.1 人 CD4 分子的结构

人CD4（Cluster of differentiation 4）分子于20世纪70年代被发现，其相对分子质量为55-60kD，是一类单链跨膜糖蛋白，在部分T细胞、胸腺细胞、单核-巨噬细胞、EB病毒转化的B细胞等表面皆有表达^[1]。人CD4分子位于人12号染色体，基因组的大小为6.77-6.80Mb^[2]，cDNA序列长约3100bp，编码区序列长1377bp，前75bp为信号肽序列^[3]。

人CD4蛋白质结构前体由458个氨基酸残基组成：信号肽25个氨基酸残基，胞膜外区371个氨基酸残基，跨膜区24个氨基酸残基以及胞质区38个氨基酸残基。成熟CD4分子胞膜外区由4个免疫球蛋白样的结构域组成，从N端（远膜端）到C端（近膜端）分别命名：D1（1-98），D2（99-178），D3（179-291）和D4（292-371）^[4]，不同域之间由疏水性氨基酸残基紧密相连。D1域由9条β链形成2个β片层，16位和84位的半胱氨酸形成二硫键；D2域由7条β链形成2个β片层，130位和159位的半胱氨酸形成二硫键；D3域内无二硫键，2个片层相隔较开；D4域包含7条链的拓扑结构，303位和345位的半胱氨酸形成二硫键，D4域也与CD4分子二聚化有关^[5]。跨膜区由疏水氨基酸组成，起固定作用。胞质区直接与p56lck相连，p56lck被激活后，胞内酪氨酸磷酸化水平增加，开启信号转导。

1.2 CD4 的相关形式

与CD4分子相关的不同形式有抗体、多肽、小分子化合物、融合蛋白四类，它们都展现了不同的生理功能。

1.2.1 CD4 抗体

现在已被广泛应用的CD4抗体：仅结合D1域的Leu3A、Q4120，仅结合D2域的TNX-355、M-T441，结合D1和D2域的cM-T412，仅结合D3域的Q425及结合D3和D4域的OKT4^[6-7]等。其中TNX-355、cM-T412、OKT4在某些疾

病的临床治疗已发挥了重要作用^[8-9]。自抗体的临床价值被重视以来, CD4 抗体的形式经历了由鼠源性抗体到人源化抗体的发展, 但目前研制的 CD4 单抗均为全抗体分子, 且抗体分子较大, 在机体中具有免疫原性, 甚至容易引起血液中某些 T 细胞亚群的大量丧失, 副作用较大^[10]。而抗体结合纳米颗粒技术的问世, 可能为 CD4 单抗治疗提供新的思路^[11]。

1.2.2 CD4 多肽

CD4 多肽和抗 CD4 抗体相比, 肽段不会引发免疫反应。根据 CD4 分子 D1 域的 CDR3 区 (85-92 位氨基酸) 设计的多肽段 rD-mPGPtide^[12]、根据 D1 域的 CC' 环设计合成一条含有 8 个氨基酸残基的肽段^[13]以及根据 D4 域的 FG、CC' 环设计的一系列多肽段^[14], 都能抑制 CD4⁺T 细胞的活化, 从而阻断 CD4 分子与相关分子的结合。而且, 根据 D1 域的 CDR3 区设计的多肽经芳香环修饰, 所得的产物与 CD4 作用, 能够特异性地抑制 HIV gp120 与 CD4 的结合^[15]。CD4 多肽的缺点在于在机体内部容易降解。

1.2.3 CD4 小分子化合物

CD4 小分子化合物自身不具有免疫原性, 且自身稳定性较好。利用计算机虚拟筛选技术从非肽类有机化合物分子库中筛选出与 CD4 结合的小分子化合物^[16], 能有效阻断 CD4 与相关蛋白的结合, 像 TJU103 和 J2^[17] 被认为具有免疫抑制药物应用的潜力。但是根据某一结构筛选出的小分子化合物大多具有细胞毒性, 在使用前应严格评价。

1.2.4 CD4 融合分子

为了使 CD4 分子自身的功能得到更大的发挥, 分别构建了不同类型的 CD4 融合分子。最常见的是 CD4 同免疫球蛋白 Ig 部分结构域融合, 使得重组蛋白具有更长的半衰期, 更适合于体内的应用, 且融合蛋白里 Fc 大大扩展了该融合分子的应用, 例如, Fc 段具有穿过胎盘、结合补体并介导补体依赖的细胞毒作用^[18-19] 等。

另外, 将 CD4 与某些靶向分子融合, 靶分子在 CD4 的介导下与靶细胞等目标物相结合, 充分发挥靶向分子的治疗效果^[20]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库